第31卷 第2期　　昆虫学报　　Vol. 31, No. 2
1988年5月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1988

桑蚕促前胸腺激素的作用与前胸腺分泌活动的某些特点

华跃进*　曹梅讯**　吴载德*
(浙江农业大学蚕桑系*,杭州,中国科学院上海昆虫研究所**,上海)

摘要　本工作以前胸腺的体外器官培养技术和蜕皮激素的放射免疫分析法 (MH-RIA) 相结合,研究了桑蚕 (*Bombyx mori*) 促前胸腺激素 (PTTH) 的作用与前胸腺分泌的某些特点。结果表明,被 PTTH 激活后的前胸腺,在一定的时相过程内合成并分泌蜕皮甾类激素;前胸腺本体不积累蜕皮甾类激素;PTTH 对前胸腺的作用是积累性的;五龄不同天数的前胸腺合成分泌蜕皮甾类激素的能力不同,并有不同的剂量反应。

关键词　桑蚕　促前胸腺激素　蜕皮甾类激素　体外器官培养　放射免疫分析法

有关昆虫前胸腺的发现以及前胸腺在昆虫生长发育过程中的生理功能,已有一些综述(大西, 1977; Bollenbacher, 1980)。目前普遍认为,昆虫的前胸腺在间脑部的神经分泌细胞合成的促前胸腺激素 (PTTH) 作用下被活化,向血淋巴中分泌蜕皮激素,与体内的保幼激素协同作用,引起昆虫的蜕皮与变态。近年来,由于实验技术的限制,有关前胸腺分泌特性的研究报告甚少。具有高灵敏度和高特异性的蜕皮激素放射免疫分析法 (MH-RIA) (Borst & O'conner, 1972) 与前胸腺体外培养技术 (Agui, 1975; Bollenbacher 等, 1979) 的巧妙结合 (Bollenbacher 等, 1979), 不仅为 PTTH 的深入研究开辟了新的途径,也为进一步研究 PTTH 与前胸腺之间的相互关系创造了条件。我们于 1984 年春季开始,借助上述二项技术,研究了桑蚕前胸腺在 PTTH 的作用下分泌蜕皮甾类激素的某些特点,本文报告此研究的结果。

材料与方法

一、供试材料　本实验采用夏秋蚕品种: 浙农1号×苏12的雄蚕。

1. PTTH 抽提物

定量剖取化蛹后 0—3 小时的蛹脑,立即放入盛有一定量低温重蒸馏水(5℃以下)的微型匀浆器内,在冰水浴中匀浆 10 分钟。匀浆液移入试管,再用重蒸馏水重复洗涤匀浆器,将洗涤液并入同一试管。沸水浴 2 分钟后立即冷却,用 10,000 转/分离心 5 分钟,吸取上清液。在沉淀物中再加少量重蒸馏水,充分混匀后,再离心并收集上清液。二次收集的上清液合并,用 LNG-T83 型离心浓缩干燥器进行浓缩干燥,干燥物于 −20℃ 中保

本文于 1985 年 12 月收到。
承蒙浙江农业大学蚕桑系徐俊良副教授提供宝贵意见,中国科学院上海昆虫研究所蒋容静同志、浙江农业大学蚕桑系袁碧华、葛秀兰和周乃明三位老师参加部分工作,在此一并致谢。

存，使用时用 Grace 液稀释至所需浓度。

2. 前胸腺

从蚕体背中线剪开，用解剖针固定于盛有 Ringer 生理盐水（7.5—8%）的蜡盘里，在解剖镜下仔细摘取前胸腺。为了保证处理与对照的一致性，采取前胸腺成对摘取。如一条蚕体内的一只前胸腺摘取不完整，则弃去这条蚕体内的两只前胸腺。将摘取完整的前胸腺移入干净的 Ringer 生理盐水中 10—20 分钟，再用 Grace 液洗涤一次（pH 6.6），供培养用。

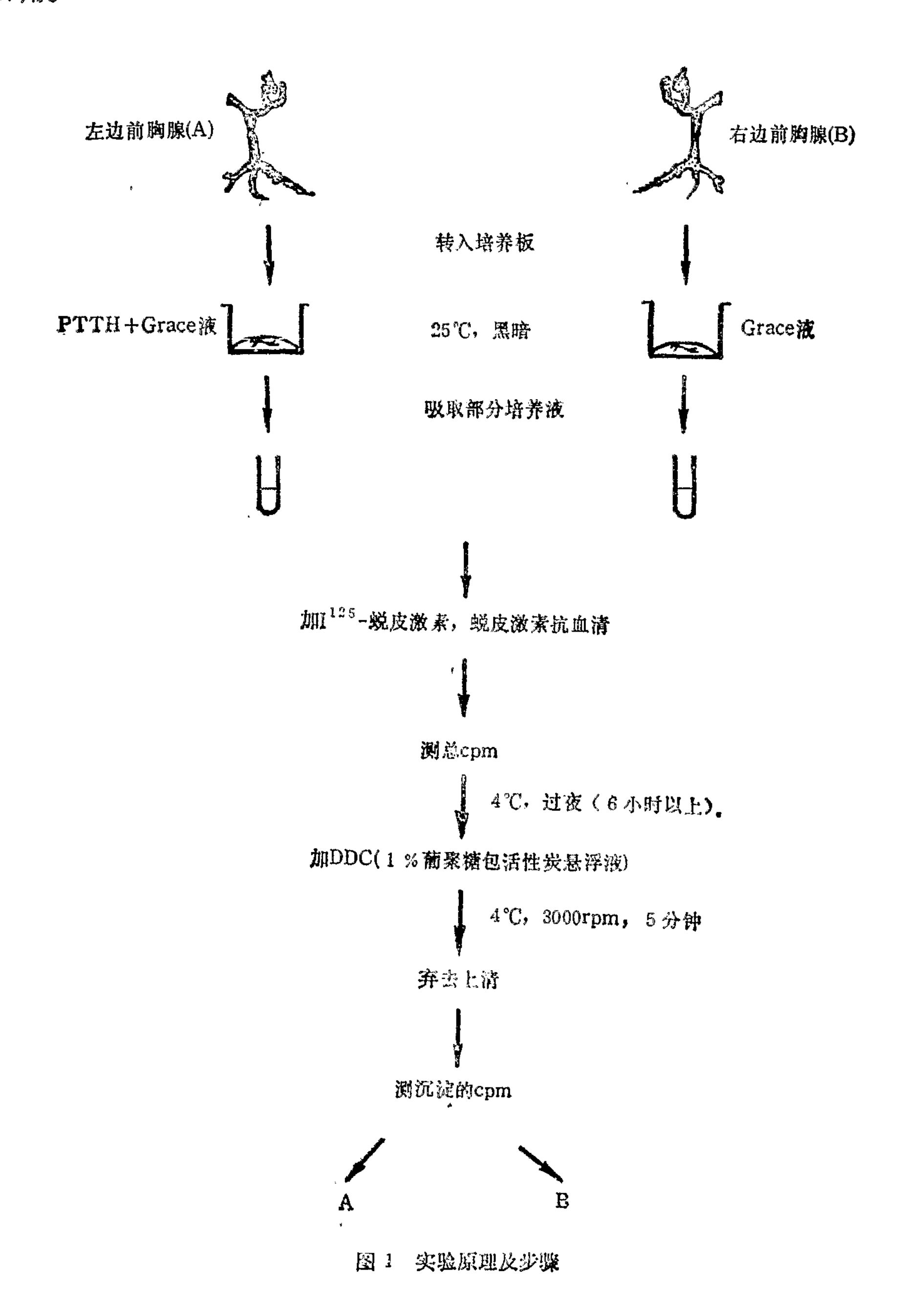


图 1　实验原理及步骤

二、方法　实验原理及步骤如图 1 所示。

1. 前胸腺的培养

将一侧的前胸腺放入 50 微升含 PTTH 的 Grace 液中，另一侧的前胸腺放入同样体积无 PTTH 的 Grace 液中作对照，悬浮培养。培养一定时间后吸取部分培养液，进行蜕皮甾类激素的放射免疫测定。左右两侧培养液中蜕皮甾类激素的含量之差即为 PTTH 的效应。

2. 蜕皮甾类激素的放射免疫测定

蜕皮甾类激素的放射免疫测定参考曹梅讯等（1980）建立的方法，在中国科学院上海昆虫研究所进行。

结　　果

一、被 PTTH 激活的前胸腺合成与分泌蜕皮甾类激素的时相进程。

1. 前胸腺合成分泌蜕皮甾类激素的时相进程

一组五龄第 6 天的一侧前胸腺加 1 脑当量的 PTTH，另一侧不加，分别培养 2、4、6、8、10、12、24 小时后收集培养液，测定其蜕皮甾类激素含量，结果如图 2 所示。加入 PTTH 的前胸腺在培养 2 小时后就有蜕皮甾类激素合成与分泌，4 小时达到高峰，6 小时仍然可以看到蜕皮甾类激素的合成与分泌，6 小时以后分泌量较少；未加 PTTH 的五龄第 6 天前胸腺在培养 4 小时以前能分泌少量蜕皮甾类激素，可能在体内已受微量 PTTH 作用。

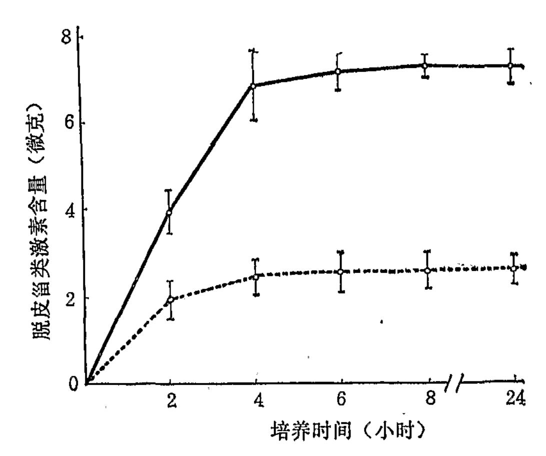


图 2　五龄第 6 天前胸腺合成分泌蜕皮甾类激素的时相进程

—— 加 1 脑当量 PTTH　　…… 未加 PTTH

2. 前胸腺合成蜕皮甾类激素后的分泌动态

测定蜕皮甾类激素的实验方法基本相同于脑内 PTTH 抽提物法。结果如表 1 所示。前胸腺在 1 脑当量的 PTTH 培养液中培养 3 小时或 6 小时，其培养液中有较多的蜕皮甾类激素，但无论在培养前或培养后，前胸腺本身的匀浆液中测不到蜕皮甾类激素。

表 1　五龄第 6 天前胸腺在培养前后，腺体本身及培养液中蜕皮甾类激素含量

培养时间（小时）	腺体内蜕皮甾类激素含量(微克/只)		培养液中蜕皮甾类激素含量(微克/只)
	培　养　前	培　养　后	
3	——	——	3.87±0.22
6	——	——	7.65±0.36

1. —— 为检测不到
2. 以上数值为四个重复的平均值

二、PTTH 对前胸腺的作用方式

取五龄第2天的前胸腺。第一组的一侧前胸腺用 0.5 脑当量 PTTH 的培养液培养6小时；第二组的一侧前胸腺用 0.25 脑当量 PTTH 的培养液培养6小时；第三组的一侧前胸腺用 0.25 脑当量 PTTH 的培养液培养3小时后，再把它移入新鲜的 0.25 脑当量 PTTH 培养液中培养3小时，即这组前胸腺在二份 0.25 脑当量 PTTH 培养液中分别培养3小时，共6小时。上述三组前胸腺的另一侧均在不含 PTTH 的培养液中培养作对照。测定培养液的结果如表2。

表2 PTTH 对前胸腺的作用形式

处理	培养液中蜕皮甾类激素含量（微克/只）
0.5 脑当量，6 小时	0.88±0.05A
0.25 脑当量，6 小时	0.48±0.03B
0.25 脑当量，3 小时 +0.25 脑当量，3 小时	0.85±0.04A

注：1. A 与 B 表示在 1% 水平极显著；
2. 表内数值为四个重复平均值。

表2表明，0.5 脑当量 PTTH 培养6小时可使五龄第2天前胸腺显著激活，而 0.25 脑当量 PTTH 培养6小时不足以显著激活，但在用 0.25 脑当量 PTTH 培养3小时之后，再把它移入新鲜的 0.25 脑当量 PTTH 培养液中继续培养3小时，分泌的蜕皮甾类激素含量与用 0.5 脑当量 PTTH 培养液培养的前胸腺相近。因此认为，PTTH 对前胸腺的作用是积累性的，积累达到一定"阈值"后，就可显著激活前胸腺。

三、五龄不同天数和化蛹当天前胸腺的合成分泌机能

分别将五龄第2、5、6天和化蛹当天的一侧前胸腺放入 50 微升含1脑当量 PTTH 的培养液中，另一侧放入不含 PTTH 的培养液中作对照，培养6小时后，测定培养液中的蜕皮甾类激素。结果如表3。

表3 五龄不同天数和化蛹当天前胸腺的合成分泌机能

	五龄前胸腺						化蛹当天前胸腺	
	第2天		第5天		第6天			
	加 PTTH	无 PTTH	加 PTTH	无 PTTH	加 PTTH	无 PTTH	加 PTTH	无 PTTH
培养液中蜕皮甾类激素（微克/只）	2.22±0.18	0.52±0.03	5.44±0.12	1.87±0.15	7.89±0.60	3.13±0.24	2.55±0.14	0.65±0.04
活化比（Ar）*	4.26±0.35		2.91±0.16		2.59±0.19		3.9±0.20	

* 活化比（Ar）：指加 PTTH 与不加 PTTH，前胸腺分泌蜕皮甾类激素之比值。
上述数据为四个重复平均值。

供试前胸腺在1脑当量 PTTH 作用下，以五龄第6天的合成分泌机能最强，平均每只可分泌 7.89 微克（μg），其余依次为：五龄第5天每只 5.44μg，化蛹当天每只 2.55μg，五龄第2天合成分泌机能最弱，每只分泌 2.22μg。由于这些前胸腺在不加 PTTH 时有

不同程度的自发分泌，所以其活化比(Ar)反而以五龄第2天最高，达4.26，其余依次为：化蛹当天3.9，五龄第5天2.91，五龄第6天2.59为最低。

四、前胸腺对 PTTH 的剂量反应

将五龄第2、5、6天和化蛹当天的一侧前胸腺分别在含4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125、0.06和0脑当量 PTTH 的50μl 培养液中，另一侧前胸腺的培养液中不加 PTTH，培养6小时后测定培养液中蜕皮甾类激素，计算活化比(Ar)。作图得到图3，是典型的 Logistic 曲线。从不同时期的前胸腺对 PTTH 剂量反应曲线可以看到，五龄第6天的前胸腺具有最低的激活临界剂量(0.06脑当量)，即此时的前胸腺对 PTTH 的敏感性最大。各时期的激活临界剂量、激活饱和剂量和最大激活中量(A_{50})可从图3求得，见表4。

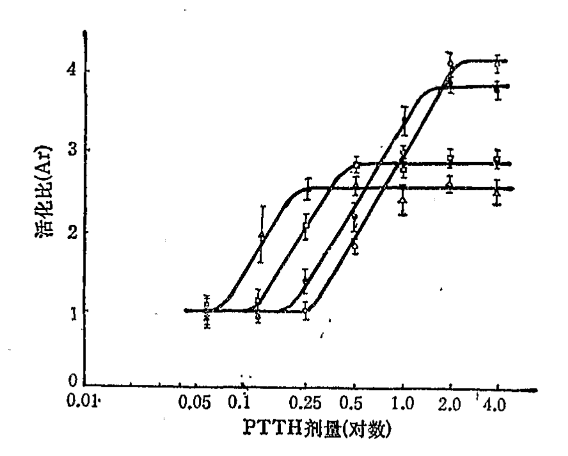


图3　五龄不同天数和化蛹当天的前胸腺对 PTTH 的剂量反应曲线

—○— 五龄第2天前胸腺　—□— 五龄第5天前胸腺
—△— 五龄第6天前胸腺　—●— 化蛹当天前胸腺

表4　五龄不同天数和化蛹当天前胸腺的激活临界剂量、激活饱和剂量和最大激活中量

	五龄第2天	五龄第5天	五龄第6天	化蛹当天
激活临界剂量(脑当量)	0.25	0.11	0.06	0.19
激活饱和剂量(脑当量)	2.5	0.50	0.25	1.5
* 最大激活中量 (A_{50})	2.63	1.96	1.80	2.45

* $A_{50} = (Ar \cdot max - 1)/2$

表4显示出，五龄第6天前胸腺最易激活，也最易饱和；五龄第2天的前胸腺则相反，既不易激活，也不易饱和。五龄第5天和化蛹当天的前胸腺处于中间状态。

讨　　论

前胸腺的活化是以 PTTH 的存在为前提的。前胸腺在一定量 PTTH 作用下，很快就能合成蜕皮甾类激素，被激活后的前胸腺在一定的时间内可以陆续合成分泌蜕皮甾类激素，这个结果与 Agui (1983) 在甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 上的实验结果一致。

合成分泌中的前胸腺本身检测不到蜕皮甾类激素，说明前胸腺本身不积累蜕皮甾类激素，合成后的蜕皮甾类激素在很短的时间内就释放到腺体外。

不同时期前胸腺具不同的合成分泌机能，与 Okuda 等 (1985)发表的结果吻合。

PTTH 对前胸腺的作用形式不是触发性的，而具有积累效应。从节约能量的观点来看，这种作用形式比较经济。Agui (1976) 曾在研究二化螟时发现，蜕皮激素对幼虫真皮作用也是积累性的。因此，激素的这种作用形式在昆虫激素调控上可能具一定普遍性。

正是由于 PTTH 对前胸腺的作用具有积累性，所以不同时期的前胸腺对 PTTH 就有不同的剂量反应。一个龄期中，越接近龄末期，前胸腺接受的"刺激"积累得越多，因此

也就越易被激活；同样道理，它也越易达到饱和。但五龄结束化蛹后，前胸腺的激活临界剂量和饱和剂量要比五龄末期高，这里有一个“刺激复位”的问题，有待于进一步研究。

参 考 文 献

曹梅讯 1980 20-羟基蜕皮酮的放射免疫分析法及在蓖麻蚕上的应用。昆虫学研究集刊第一集：1—6。

大西英尔 1977 前胸腺とエクダイソン，现代動物学の课题 5。変態，pp43—76，日本動物学会编，学会出版センター，东京。

Agui, N. 1975 Activation of prothoracic glands by brains in vitro. *J. Insect Physiol.*, 21: 903—13.

Agui, N. et al 1983 In vitro analysis of prothoracicotropic hormone specificity and prothoracic gland sensitivity in *Lepidoptera*. *Experientia*. 39: 983—8.

Bollenbacher, W. E. et al 1979 In vitro activation of insect prothoracic glands by the prothoracicotropic hormone. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 76: 5148—52.

Bollenbacher, W. E. et al 1980 Insect prothoracic glands in vitro: a system for studying the prothoracicotropic hormonc. pp. 253—271, In 'Invertibrate System In Vitro', Kurstak Maramorosch Dübendorfer (eds), Elsevier Northholland Biomedical Press.

Borst. D. W. & O'conner, J. D. 1972 Arthropod molting hormone: Radioimmunoassay. *Science* 178: 418—9.

Chang. E. S. & O'conner, J. D. 1979 Arthropod molting hormone, In 'Methods of hormone radioimmunoassay'. second edition pp. 797—814. Academic Press Inc.

Minchise Okuda et al 1985 Activity of the prothoracic gland and its sensitivity to prothoracicotropic hormone in the penultimate and last larval instar of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 31: 455—61.

THE ACTION OF PROTHORACICOTROPIC HORMONE AND SOME CHARACTERISTICS OF PROTHORACIC GLAND ACTIVITY IN *BOMBYX MORI*

HUA YUE-JING* CAO MEI-XUN** WU ZAI-DE**

(Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica** Shanghai)*

The action of the prothoracicotropic hormone (PTTH) and the secretory activity of the prothoracic gland (PG) of the silkworm *Bombyx mori* were studied by combining the methods of *in vitro* culture of PG from the last instar larva and from newly formed pupa under the influence of PTTH extracted from the brain of newly formed pupa and radioimmunoassay (RIA) of the ecdysteroid hormone secreted from PG. The objective of this study is to elucidate the action of PTTH and the secretory activity of PG in more detail. The results show that under the experimental condition the brain extraction of newly formed pupa contains enough PTTH to activate the PG of the larva in the last instar and of the newly formed pupa. The secretory activity of PG is characterized by the following respects: 1. The activated PG displays a time course of its own activity in ecdysteroid hormone synthesis and secretion. 2. The hormone synthesized would not accumulate in the PG. 3. The action of PTTH on PG is accumulative in the sense that a threshold titer of PTTH is required for activating the PG. 4. The PG's of larva on different days of the last instar are different in their sensitivity to the influence of PTTH and the capacity of hormone synthesis. PG of the 6th day larva is most easily to be activated and to reach the upper limit of secretion, that of the 2nd day larva is least to do so, and that of the 5th day larva or of the newly formed pupa remains in the intermediary condition.

Key words *Bombyx mori*——prothoracicotropic hormone——ecdysteroid hormone——culture *in vitro*——RIA